

EP98/07389

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



E.P.U.

RECEIVED	19 JAN 1999
IN-PC	POT

## Bescheinigung

Die Pharma-Zentrale GmbH in Herdecke/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verwendung von Escherichia coli Stamm DSM 6601  
zur Behandlung von Diarrhoeen auf dem Veterinär-  
sektor"

am 22. November 1997 beim Deutschen Patent- und Markenamt  
eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-  
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig  
das Symbol A 61 K 35/74 der Internationalen Patentklassifikation  
erhalten.

München, den 30. November 1998  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Wöhner

Aktenzeichen: 197 51 907.5

N 11.12.98

**Verwendung von Escherichia coli Stamm DSM 6601  
zur Behandlung von Diarrhoeen auf dem Veterinärsektor**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Escherichia coli Stamm DSM  
5 6601 zur Prophylaxe und Behandlung von mikrobiell bedingten Diarrhoeen  
bei Tieren.

Unter Diarrhoeen bei Menschen oder Tieren wird die häufige Entleerung von  
dünnflüssigen Faeces verstanden, deren Ursache unterschiedlich sein kann  
10 wie beispielsweise eine allergische Reaktion auf bestimmte Nahrungsmittel,  
weist aber eine Reaktion auf Mikroorganismen, und zwar Bakterien, Pilze  
oder Viren oder deren Toxine. Länger dauernde Diarrhoeen können aufgrund  
des starken Wasser- und Salzverlustes zu schweren Komplikationen bis hin  
zum Exitus führen. Schwerere Diarrhoeen sind daher auf jeden Fall  
15 behandlungsbedürftig, insbesondere dann, wenn es sich um junge oder  
bereits geschwächte Menschen oder Tiere handelt.

In einem Großteil der Fälle werden Diarrhoeen durch Bakterien verursacht,  
die nicht zu der normalen Mikroorganismenflora des betreffenden Körpers  
20 gehören, wobei insbesondere bestimmte pathogene Stämme von Escherichia  
coli, Salmonellen und Shigellen eine Hauptrolle spielen. Neben Bakterien  
können Diarrhoeen aber auch ausgelöst werden durch Infektionen mit Viren,  
insbesondere Corona- und Rotaviren oder durch Pilze, die in den meisten  
Fällen zu den Eumykota gerechnet werden. Während bakteriell bedingte  
25 Diarrhoeen heute in der Regel durch die Gabe von Sorbentien oder  
nichtsystemischen Sulfonamiden oder Antibiotika recht gut bekämpft werden  
können, gibt es noch keine Arzneimittel, die erfolgreich bei Virusinfektionen

eingesetzt werden können und kaum Arzneimittel, die bei der Besiedlung des Magen-Darmtraktes mit Pilzen wirksam sind.

- Als Pilze bezeichnet man eine polyphylogenetische Gruppe von chlorophyll-
- 5 freien, heterotrophen und eukaryotischen Organismen, die ein- oder viel-
- zellig sein können und deren Vermehrung wie bei allen Eukaryonten mit
- Mitose und Meiose verläuft und durch die Bildung geschlechtlicher oder
- ungeschlechtlicher Sporen, aber auch durch Sprossen. Die einzelligen, sich
- 10 nur durch Sprossen fortpflanzenden Pilze werden häufig als Hefen zusam-
- mengefaßt, obgleich die Hefen ein Konglomerat verschiedener Verwand-
- schaftskreise darstellen. Fast alle Eumykota, also die echten Pilze, durchlau-
- fen während der Individualentwicklung zwei oder mehrere morphologisch
- unterscheidbare Stadien, nämlich als Teleomorphe, bei der die Sporen nach
- der Meiose gebildet werden und ein oder mehrere Stadien als Anamorphe,
- 15 bei denen die Sporenbildung nicht in Verbindung mit der Meiose steht.
- Pilze, deren Teleomorphe unbekannt sind oder die die Fähigkeit verloren
- haben, solche zu bilden, werden als Fungi imperfecti zusammengefaßt. Die
- genaue botanische Klassifikation ist bei den Pilzen häufig noch offen.
- 20 Aufgrund ihres Chlorophyllmangels ernähren sich alle Pilze heterotroph
- durch Abbau organischer Substanzen; sie sind also Saprophyten. Medizinisch
- unterscheidet man zwischen den Opportunisten, also Saprophyten, die
- selten und nur unter ganz bestimmten Bedingungen pathogen werden
- können und wozu beispielsweise Candida und Aspergillus gehören. Soge-
- 25 nannte pathogene Saprophyten führen exogen ein normales
- saprophytierendes Leben, aber sie sind für Menschen oder Tiere unter allen
- Umständen als pathogen zu betrachten, wenn eine Infektion stattgefunden

hat. Es gibt auch unter den Pilzen obligate Parasiten, die außerdem des Wirtsorganismus nicht vegetieren können und die nur beim Menschen oder beim Tier gefunden werden; hierzu gehören die meisten Dermatophyten.

- 5 Ein wesentlicher Unterschied zwischen Bakterien und Pilzen liegt in der Tatsache begründet, daß Pilze im Gegensatz zu Bakterien Eukaryonten sind, also über einen Kern mit Membran und außerdem im Gegensatz zu Bakterien auch über Mitochondrien verfügen und daß die Zellwand aus Chitin und/oder Cellulose besteht, während die Zellwand der Bakterien aus Mucopeptiden aufgebaut ist. Dies erklärt auch, warum die meisten bei 10 Bakterien wirksamen Antibiotika bei Pilzen versagen, denn bei vielen bekannten Antibiotika sind die Bakterienwand oder die Mitochondrien Hauptangriffspunkte dieser Stoffe.
- 15 Es gibt auch einige Antibiotika, die auch systemisch, also nicht nur topisch, gegen Pilzinfektionen eingesetzt werden können und die sich durch eine Polyenstruktur auszeichnen, wie beispielsweise Amphotericin B, Griseofulvin, Natamycin und Nystatin. Synthetische systemische Antimycotica sind Flucytosin und eine Reihe von Azolderivaten wie Ketoconazol und Miconazol oder Fluconazol und Itraconazol. 20

Während der genaue Wirkungsmechanismus der Polyenantibiotika noch nicht in allen Einzelheiten bekannt ist, wirken die synthetischen Azolderivate auf die Ergosterolsynthese in der Zellmembran und beeinflussen damit die 25 Durchlässigkeit der Zellwand.

Ein Nachteil aller bisher bekannten auch systemisch einsetzbaren Antimykotika besteht darin, daß sie in der Regel nicht fungizid, sondern nur fungistatisch wirken und damit eine längere Behandlungsdauer erforderlich machen. Weiterhin gibt es Kreuzresistenzen sowohl bei den Polyenantibiotika wie auch bei den Azolverbindungen und schließlich kommt hinzu, daß der Preis dieser Produkte relativ hoch ist, was einer breiten Anwendung in der Veterinärmedizin entgegensteht.

Es besteht daher noch ein weiteres Bedürfnis nach Veterinärarzneimitteln, die in der Lage sind, Diarrhoeen bei Tieren, die im wesentlichen oder auch durch die Mitbeteiligung von pathogenen Pilzen bedingt sind, wirksam bekämpfen zu können.

Völlig überraschend wurde jetzt festgestellt, daß bei Verwendung von *Escherichia coli* Stamm DSM 6601 derartige Diarrhoeen gut bekämpfbar sind, selbst wenn die sonst übliche Medikation mit pilzwirksamen Verbindungen versagt hat.

*Escherichia coli*, im folgenden als *E. coli* abgekürzt, fällt in zahlreichen Varianten an, die sich hinsichtlich der Kapselantigene, Oberflächenantigene und Flagellenantigene unterscheiden und daher in zahlreiche serologische Typen unterteilt werden können. Die Einordnung nach Serotypen besagt allerdings nichts über die unterschiedliche Virulenz der Erreger. Vertreter ein- und desselben Serotyps können sowohl im menschlichen als auch im tierischen Körper ein unterschiedliches Pathogenitätspotential besitzen, das im Extremfall von avirulent bis hochgradig pathogen reichen kann. Es ist allerdings bekannt, daß der *E. coli* Stamm DSM 6601 nicht als human- oder

tierpathogen bewertet wird. Dieser Stamm wird beispielsweise in der Humanmedizin als Substitutionpräparat bei infektiösen Darmerkrankungen durch Salmonellen oder Shigellen eingesetzt, und zwar sowohl bei akuten wie auch bei chronischen Fällen. Auch bei sonstigen Störungen der Darmflora wie z.B. nach Antibiotikabehandlung oder Bestrahlung wird dieser E. coli Stamm mit Erfolg in der Substitutionstherapie benutzt. Ob es sich dabei tatsächlich nur um die Verdrängung der pathogenen Bakterienstämme mit den entsprechenden Varianten von E. coli oder Proteus durch diesen speziellen E.-coli-Stamm handelt, also um eine Reduzierung der Toxine, oder ob die Stoffwechselprodukte des Stammes E. coli DSM 6601 von sich aus eine therapeutische Wirksamkeit entfalten, ist nicht eindeutig geklärt.

Ausgehend von diesen bekannten Erklärungen zum Wirkungsmechanismus von lebenden E.-coli-Keimen war aber in keiner Weise zu erwarten, daß eine Behandlung mit diesen lebenden Kulturen eine überraschend umfassende Wirksamkeit bei der Infektion des Darmtraktes von Tieren mit Pilzen und hier insbesondere Hefen, zeigen würde. Zwar waren in den fünfziger Jahren apathogene E. coli Stämme in der Tiermedizin gelegentlich bei Erkrankungen von Rindern oder Schweinen, die zum Teil auch mit Diarrhoeen einhergingen, eingesetzt worden, aber dabei handelte es sich um die Therapie von Ernährungsstörungen bei Ferkeln (Fischer W., Erfahrungen eines praktischen Tierarztes bei der Behandlung kranker Ferkel in den Jahren 1945 bis 1950; Dissertation, Universität München 1950) oder um die Behandlung der sogenannten Semperkrankheit bei Rindern, der nach den Ergebnissen dieser Veröffentlichung offensichtlich eine Mangelernährung aufgrund der Geologie des Gebietes zugrundelag (Häfele W., Die „Semperkrankheit“ eine Ernährungs- und Entwicklungsstörung des Rindes im Hochschwarzwald in der

Umgebung von St. Blasien; Dissertation, vet. med. Tierklinik, Universität München 1952). Diese frühen Versuche, bestimmte Coli-Stämme bei speziellen Erkrankungen von Schweinen oder Rindern versuchsweise einzusetzen, waren völlig vereinzelt und haben nicht einmal dazu Veranlassung gegeben, bei bakteriell bedingten Diarrhoeen weitere Versuche solcher Art zu unternehmen. Um so überraschender war die Feststellung, daß der E.-coli-Stamm DSM 6601 eine überraschende Wirkung auch bei Darmerkrankungen zeigt, die ausschließlich oder wesentlich mit durch Pilze bedingt sind, da die Bekämpfung von Pilzinfektionen, insbesondere wenn die Schleimhäute des Darmes betroffen sind, besonders schwierig ist, da die bei bakteriellen Infektionen eingesetzten Präparate praktisch keine Wirkung zeigen.

Bis heute hin ist über die normale Darmflora bei verschiedenen Tierarten überraschend wenig bekannt, aber ein Befall des Gastrointestinaltraktes mit Pilzen und insbesondere mit Hefen ist immer als pathologisches Geschehen zu deuten.

Die überraschend schnelle Wirksamkeit der Behandlung mit E. coli Stamm DSM 6601 läßt den Schluß zu, daß die Wirkung dieser Behandlung nicht oder nicht nur auf der Substitution der Pilzflora durch eine gesunde Bakterienflora beruht, sondern daß der Stamm in großem Maße zu einer Steigerung der körpereigenen Abwehrkräfte beiträgt, wobei vermutet werden kann, daß die Stoffwechselprodukte dieses Stammes eine beträchtliche immunstimulatorische Wirkung haben.

25

Im folgenden wird die Erfindung anhand eines Beispieles näher erläutert:

## Beispiel:

In einer Milchviehanlage in Sachsen, die im Mittel über einen Tierbestand von 1.480 Milchkühen, 600 Färsen und Jungrindern und 185 Kälbern verfügt, war bis Anfang Januar 1997 der Kälberbestand durch sehr gute Aufzuchtsergebnisse, geringe Morbidität und Mortalität gekennzeichnet. Manifeste Magen- und Darmerkrankungen mit Durchfällen waren außerordentlich selten. Verluste an Kälbern lagen stets unterhalb der 3 %-Grenze, bezogen auf die Zahl der lebend geborenen Kälber.

10

Ende Januar 1997 kam es im Bestand plötzlich zum gehäuften Auftreten von Durchfällen mit klinisch markanten Symptomen einer Gastroenteritis. Die Erkrankungen begannen bei den Kälbern im Alter von sieben bis elf Tagen, waren von unterschiedlicher Dauer und durch eine Morbidität von mehr als 90 % und eine Mortalität von mehr als 10 % gekennzeichnet. Dabei war der Krankheitsverlauf durch folgende Symptome geprägt: anfänglich grünlich-gelblicher Durchfall mit dickbreiiger Konsistenz, danach wurde der Kot im weiteren Krankheitsverlauf schleimig, zunehmend dünnbreiig und meistens wässrig. Die Werte der Körpertemperaturen waren zu Beginn der Erkrankung leicht erhöht (39,7 bis 39,9° C), sanken dann aber im weiteren Verlauf rasch ab und erreichten nur noch untere Grenzen, teilweise im Bereich von 37,8 bis 37,5° C. Die erkrankten Kälber zeigten ausgeprägte Saugunlust und zunehmende Schwäche, so daß es im weiteren Krankheitsverlauf zum Festliegen kam. Schwerkranke Tiere mußte zwangsernährt werden.

20

Nach einer Krankheitsdauer von drei bis neun Tagen kam es zu immer höheren Verlusten. Die durchgeführten Sektionen zeigten übereinstimmend

M 11.12.99

-8-

höchst auffällige Befunde, nämlich einen flüssigen, flockigen bis leicht blutigen Darminhalt und hochgradige, geschwürige Vormagen- und Labmagenentzündungen. Im Monat April 1997 erreichte die Erkrankungshäufigkeit Werte von nahezu 100 % und die Mortalität stieg auf  
5 mehr als 15 %.

Die mikrobiologischen Untersuchungen des Magen- und Darminhaltes sowie der inneren Organe waren anfänglich ohne spezifische Ergebnisse, bis im Februar 1997 bei zwei verendeten Kälbern aus Magen- und Darminhalt  
10 Hefen der Gattung *Candida* (*C. glabrata* und *C. albicans*) isoliert wurden. Darmpathogene *E. coli* wurden nicht gefunden. Der Nachweis dieser Hefen gelang bei allen weiteren Sektionen der verendeten Kälber und bei den Untersuchungen von Kotproben von Kälbern und ihren Müttern. Weiterführende gezielte Untersuchungen von Kot- und Colostrumproben der Kühe und  
15 Färsen brachten gleiche Ergebnisse. Ergänzende Untersuchungen auf Viren, nämlich Corona- und Rotaviren, sowie auf Cryptosporidien ergaben nur in zwei Fällen bei verendeten Kälber Coronaviruspartikel und in einem Fall Rotaviren.

Die Herkunft der Hefen war lange Zeit nicht erklärbar, bis es im März 1997 bei der Untersuchung von als Futtermittel eingesetzten Biertrebern gelang, Hefen (*Candida glabrata* dominierend) in einem Umfang von  $3,6 \times 10^7$  KBE/g Futtermittel nachzuweisen.

Die von Anfang an umfangreich durchgeführten therapeutischen Maßnahmen wie Diättränken, Antiphlogistika, Styptica, Elektrolytika und Herz- und Kreislaufmittel führten nur zu unbefriedigenden Ergebnissen. Bei Anwendung

von Sulfonamiden und Antibiotika verendeten die Tiere sechs bis acht Stunden nach der Applikation. Nachdem diese Therapien erfolglos blieben, wurden Therapeutika, die Huminsäuren als wirksame Substanzen enthalten, eingesetzt. Auch diese Maßnahmen erbrachten keine erkennbaren  
5 Besserungen des Krankheitsgeschehens.

Von den in zwei Monaten vom 24. April bis 23. Juni 1997 lebend geborenen 236 Kälbern erkrankten alle Tiere, wobei 41 Tiere in diesem Zeitraum verendeten, was einem Anteil von 17,4 % entspricht, und zwar 29 Tiere  
10 durch Diarrhoeen entsprechend 70,7 % der Verluste und acht Tiere an Diarrhoeen mit begleitender Bronchopneumonie entsprechend 19,5 % der Verluste und vier Tiere aus sonstigen Gründen, entsprechend 9,8 % der Verluste.

15 Im Zeitraum vom 24. Juni 1997 bis 04. September 1997 wurde dann bei 300 neugeborenen Kälbern eine Suspension von lebenden E. coli Stamm DSM 6601 in einer Menge von täglich von 15,0 ml je Kalb entsprechend ... KBE/ml gegeben. Diese Dosis war unabhängig vom Gewicht und Alter des Tieres und wurde oral appliziert, und zwar während einer Zeitdauer von 10  
20 bis 13 Tagen post partum. Im Zeitraum vom 24. Juni bis 08. Juli 1997 wurden in dieser Weise 61 Kälber behandelt, von denen zwei an einer Diarrhoe erkrankten, was einer Morbidität von 3,3 % entspricht. Keines der Tiere verendete an dieser Krankheit.

25 Im Zeitraum vom 09. Juli bis 23. Juli 1997 wurden 49 Kälber entsprechend behandelt, von denen keines an einer Gastroenteritis mit Diarrhoe erkrankte. Die Mortalität an dieser Erkrankung betrug also 0 %.

M 11.12.99

-10-

Im Zeitraum vom 23. Juli bis 06. August 1997 wurden 64 Kälber behandelt, von denen zwei an einer Diarrhoe erkrankten, was einer Morbidität von 3,1 % entspricht. Keines der Tiere verendete an dieser Erkrankung, so daß inso-  
5 weit die Mortalität gleich 0 ist.

Nachdem alle vorhandenen therapeutischen Möglichkeiten ausgeschöpft waren, konnte durch die prophylaktische und therapeutische Anwendung einer E. coli Stamm DSM 6601-Suspension das Auftreten von Diarrhoeen  
10 aufgrund von Gastroenteritiden bei Saugkälbern nahezu vollständig verhindert werden.

Der Einsatz von anderen Arzneimitteln und Diätetika konnte erheblich reduziert werden, so daß die dafür aufzuwendenden Kosten sich um 70 %  
15 verringerten.

M 11.12.90

### Patentansprüche

1. Verwendung von Escherichia coli Stamm DSM 6601 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe und Behandlung von mikrobiell bedingten Diarrhoeen unter Beteiligung von pathogenen Pilzen bei Tieren.  
5
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel in Form einer Suspension mit einem Gehalt an ... KBE/ml vor-  
10 liegt.